

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592712

研究課題名(和文) 脂肪組織由来多系統前駆細胞を用いた遺伝子導入を伴わない平滑筋再生の基礎的研究

研究課題名(英文) Basic study for adipose tissue-derived multipotent progenitor cell-based smooth muscle regeneration without gene transfer

研究代表者

一瀬 晃洋 (Ichinose, Akihiro)

神戸大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：90362780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：皮下脂肪組織から脂肪組織由来多系統前駆細胞(ADMP細胞)を単離し、薬剤添加培地で培養し、遺伝子導入によらない平滑筋細胞への分化誘導技術を最適化した。また、こうして得られた細胞の動物への細胞移植実験で平滑筋細胞への分化と生着・平滑筋組織構築の検討を行い、採取・培養・注入条件をさらに最適化した。本研究の成果は、安全で低侵襲な平滑筋機能障害性疾患の治療の開発へと繋がることが期待される。例えば、腹部の皮下脂肪を少量吸引し、遺伝子操作を加えずに薬剤処理したADMP細胞の注入による、先天性・筋原性・老人性眼瞼下垂症、排尿や排便の括約筋などの再建などの平滑筋機能障害の革新的な治療の開発である。

研究成果の概要(英文)：We established technologies for collection of adipose tissue-derived multipotent progenitor, ADMP cells from subcutaneous adipose tissues, culture of the cells and differentiation to smooth muscle cells from the cells. Moreover we transplanted the cells into animals and analyzed engraftment and differentiation of them, thereby optimizing the processes.

The achievement could be expected to provide development of safe and minimally invasive treatment for diseases caused by smooth muscle dysfunction. With our current technologies, we can obtain ADMP cells by harvesting only small amount of subcutaneous adipose tissues and culture without gene transfer. The transfusion of the ADMP cells could be innovative therapies for ptosis and sphincter dysfunction of the anal and the urethra.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 平滑筋

1. 研究開始当初の背景

1. 筋疾患・欠損に対する再生医療の必要性

再生医療による筋組織の再建法の開発は喫緊の課題である。形成外科領域では、先天性眼瞼下垂や顔面神経麻痺、外傷や腫瘍切除後の筋欠損等に対する骨格筋・平滑筋機能再建は長年挑戦されてきた。既存の治療法の筋移植術等では本来の筋機能を得ることは困難であり、かつ筋採取によるドナーの犠牲を伴うという欠点がある。

2. 筋組織再生医療の実現の壁 - 遺伝子導入

近年再生医療の研究が進んでいるが、その臨床応用のためには遺伝子導入に伴うリスクを解決する必要がある。遺伝子導入は、幹細胞を目的の細胞へ効率的に分化促進するために用いられている。しかし、遺伝子導入においては、発癌遺伝子などの遺伝子の導入や活性化の可能性がある。筋組織再生においても、遺伝子導入を伴わない再生医療が可能ならば、実用化に一步近づくといえる。

3. 平滑筋細胞の再生に取り組む理由 - 既存の遺伝子導入なしでの分化誘導法とその課題

既存の筋細胞の再生技術の中で、平滑筋細胞は脂肪幹細胞から、遺伝子非導入なしでSPC(Sphingosylphosphorylcholine) 加培地で分化誘導されることが確認されている(文献1)。しかしながら、遺伝子非導入の分化誘導における最大の課題は、目的の細胞への分化の効率が著減することである。本技術の臨床応用のためには、高効率で分化誘導可能な幹細胞の培養技術の開発が鍵となる。

2. 研究の目的

申請者が新規に開発した脂肪組織由来体性幹細胞：**脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMP 細胞 (adipose tissue-derived multipotent progenitor cell))** (PCT/JP2008/060977・特願 2007-157389) の採取・単離・培養技術を基盤とし、薬剤加培地で**遺伝子操作なしで平滑筋細胞への分化誘導の高効率化**を図る。さらに、動物実験にて同細胞を上眼瞼の平滑筋近傍へ注入することにより、**平滑筋への分化誘導**を検証する。

3. 研究の方法

1. ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMP 細胞) 由来再生平滑筋細胞の作成

脂肪組織の採取

形成外科の手術(皮下脂肪吸引、皮下組織切除等)において、通常は廃棄する脂肪を5-10ml 利用した。患者の同意を得て行った。

ADMP 細胞の単離

我々がこれまでに開発してきた脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMP 細胞) の採取・単離・培養技術により、高純度かつ高収率に幹細胞を得た。脂肪組織より得られた細胞群の中で、未分化である幹細胞の接着性が他の細胞と異なる性質を利用して、EDTA 処理によって不要な細胞を除去して、高純度の ADMP 細

胞を得た。この幹細胞群は、不要な細胞を含まないために培養を重ねても幹細胞の純度が低下することなく、も高効率での分化誘導が可能であり、遺伝子導入をしない平滑筋細胞培養において非常に有利となるものである。

平滑筋前駆細胞への分化誘導

ADMP 細胞を SPC 加培地で培養し、回収した細胞を Real Time PCR 法により平滑筋細胞特異的遺伝子の発現量を検討した。平滑筋細胞特異的遺伝子である Transgelin1, Calponin1, Caldesmon の定量を行った。Real Time PCR 法による発現遺伝子量や、Western blotting 法による発現蛋白量等の検討も行った。培養する細胞濃度、培養液に加える SPC 濃度、培養期間などの諸条件を変化させてデータの蓄積を行い、平滑筋細胞への分化誘導の効率化を行った。

4. 研究成果

平成 24 年度の研究により、ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMP 細胞) の分離・培養技術の安定化および効率化を成果として得ることができた。実施計画に沿って人の皮下脂肪を収集し、脂肪由来再生平滑筋細胞の作製を行った。ADMP 細胞からの平滑筋細胞への分化誘導を行った。計測したこうもくとしては、1) SPC 加培地で培養後の細胞における Real Time PCR 法を用いた平滑筋細胞特異的遺伝子の発現量、2) 平滑筋細胞特異的遺伝子である Transgelin1, Calponin1, Caldesmon の定量、3) これらの遺伝子の Western blotting 法によるタンパク質発現量などである。本研究の推進のためには ADMP 細胞の分離・培養生成が第一の鍵であるが、研究期間を通して安定かつ効率的な ADMP 細胞の生成と分化培養をなしえたことは、その後の研究推進を非常に有利にするものであった。

平成 25 年度は、前年度の成果であった ADMP の分離・培養技術およびその平滑筋への分化誘導によって得られた細胞による、動物への移殖・生着を目指して研究を行った。予備的検討実験においては、委嘱細胞の生着は見られなかった。原因として、移殖手技の問題と移殖細胞の数および質の問題が可能性として考えられたが、動物愛護の立場から動物実験を最小限にするため、後者についてまず検討を進める方針とした。その結果、それまでに実施していた手法では得られる ADMP 細胞由来平滑筋細胞の数は安定せず、Real-Time PCR 法や Western Blotting 法による分化マーカー遺伝子発現の定量的評価においても、その安定性が十分ではないことがわかった。そこで、ADMP 細胞由来平滑筋前駆細胞の質の向上および得られる細胞数の増大を目指して、ADMP 細胞の分離・培養および分化誘導の各プロセスについてのさらなる最適化の検討を行った。具体的には EDTA 処理時間や機械的操作の細部、分化誘

導培地の組成などの検討を実施した。その結果、ADMP 細胞由来平滑筋前駆細胞の数、質ともに安定して得られるようになった。

採取年度には、前年度までの成果である安定かつ効率的な ADMP 細胞の採取・分離・培養技術をもとに、得られた ADMP 細胞の動物上眼瞼への細胞移植実験を主に行った。具体的には、ADMP 細胞由来平滑筋前駆細胞の作製、平滑筋前駆細胞の動物への上眼瞼への注入、平滑筋の分化・生着の組織学的・免疫組織化学的評価を経て、脂肪組織採取・培養・注入条件の検討を実施し、最適な条件を見出した。

以上の期間全体を通じた成果を要約すると、皮下脂肪組織から ADMP 細胞を単離し、SPC 加培地において培養し遺伝子導入を行うことなしに平滑筋細胞への分化を誘導する技術の最適化と、そのようにして得られた細胞の動物上眼瞼への細胞移植実験によって、平滑筋細胞への分化と生着・平滑筋組織構築を評価し、採取・培養・注入にいたる一連のプロセスの最適化を行うことができた。

本研究の成果は、安全で低侵襲な平滑筋機能障害性疾患の治療の開発へと繋がるのが期待される。例えば、先天性・筋原性・老人性眼瞼下垂症、尿道あるいは肛門括約筋の弛緩などの、平滑筋機能障害の革新的な治療の開発である。さらに、平滑筋は多くの臓器や血管等の機能において不可欠であることから、本研究成果が様々な臓器再生の材料を供給しうるものになることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Okura H, Soeda M, Morita M, Fujita M, Naba K, Ito C, Ichinose A, Matsuyama A. Therapeutic potential of human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells in liver fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun.* (査読あり) 2015 Jan 24;456(4):860-5. Epub 2014 Dec 6. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.11.122.

Moriyama H, Moriyama M, Sawaragi K, Okura H, Ichinose A, Matsuyama A, Hayakawa T. Tightly regulated and homogeneous transgene expression in human adipose-derived mesenchymal stem cells by lentivirus with tet-off system. *PLoS One.* (査読あり) 2013 Jun 12;8(6):e66274. DOI: 10.1371/journal.pone.0066274.

Okura H, Saga A, Soeda M, Miyagawa S, Sawa Y, Daimon T, Ichinose A, Matsuyama A. Intracoronary artery transplantation of cardiomyoblast-like cells from human

adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells improve left ventricular dysfunction and survival in a swine model of chronic myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun.* (査読あり) 2012 Sep 7;425(4):859-65.

DOI:10.1016/j.bbrc.2012.08.004.Epub 2012 Aug 7.

Moriyama M, Moriyama H, Ueda A, Nishibata Y, Okura H, Ichinose A, Matsuyama A, Hayakawa T.

Human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells exposed to oxidative stress induce neurite outgrowth in PC12 cells through p38 MAPK signaling. *BMC Cell Biol.* (査読あり) 2012 Aug 7;13:21.

DOI: 10.1186/1471-2121-13-21.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一瀬 晃洋 (ICHINOSE, Akihiro)
医学部附属病院 特命准教授
研究者番号: 90362780

(2) 研究分担者

松山 晃文 (MATSUYAMA, Akifumi)
医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部
部長心得
研究者番号: 10423170

柿崎 裕彦 (KAKIZAKI, Hirohiko)
愛知医科大学 医学部 教授
研究者番号：20329783

(3)連携研究者

()

研究者番号：